

VARIACION DEL CONTENIDO EN ACIDOS FENOLICOS DE ORIGANUM X MAJORICUM EN DIVERSOS ESTADIOS DE LA PLANTA, POR HPLC.

O.M. PALOMINO*; M.P. GÓMEZ-SERRANILLOS**; E. CARRETERO** & M.A. CASES*

*CIT-INIA.CARRETERA DE LA CORUÑA, KM 7,300. 28040 MADRID.

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, FACULTAD DE FARMACIA, UCM. 28040 MADRID.

RESUMEN

La especie *Origanum x majoricum* Cambessedes (*Labiadas*), híbrido resultante de *O. majorana* (*Majorana hortensis*) y *O. vulgare*, es una planta autóctona de la isla de Mallorca, cuya riqueza en aceites esenciales ha llevado a su empleo como expectorante, espasmolítico, antiséptico, analgésico y antibacteriano. Diversas especies de este género son utilizadas por la industria alimentaria tanto por sus características organolépticas como por las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que les confiere su contenido en ácidos fenólicos, flavonoides y elementos minerales.

Dentro del estudio de los principios activos de *O. x majoricum*, abordamos en el presente trabajo el análisis de su contenido en ácidos fenólicos en diversos estadios de la planta: fase previa a la floración, plena floración y después de la misma. Este ensayo se realiza por triplicado, sobre muestras procedentes de tres parcelas cuya localización fue establecida al azar dentro del campo de cultivo, y en dos recolecciones.

El análisis cuali y cuantitativo de los ácidos fenólicos ha sido realizado por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) en su modalidad de fase inversa, utilizando como fase móvil Metanol (bomba A) y Agua:Acido acético (2%) (bomba B), en una elución en gradiente lineal comenzando con 20 % A y aumentando hasta el 90 % en 25 min.

De los resultados obtenidos podemos determinar el momento óptimo para la recolección de la planta, de manera que el rendimiento en ácidos fenólicos sea el más favorable.

P.C.: *Origanum*, *Labiatae*, ácidos fenólicos, HPLC

SUMMARY

Origanum x majoricum Cambessedes (*Labiatae*) is the result of the hybridization between *O. majorana* (*Majorana hortensis*) and *O. vulgare*; this specie is used because of its expectorant, spasmolytic, antiseptic, analgesic and antibacterial properties mainly due to its essential oil content.

We now analyze the phenolic acid content of *O. x majoricum* as a part of our ongoing studies on the active principles of this specie. This analysis was carried out in four different plant stages: much before flowering, before flowering, in flower and after flowering, this assay being done twice, in a First and a Second collection on samples obtained from three parcels wick location was hazardly established into de assay field.

The qualitative and quantitative assesment was carried out by reversed-phase high-performance liquid-chromatography (HPLC). The eluents were Methanol from pump A and

Water-acetic acid (98:2) from pump B in a gradient elution that started with 20% A and went on increasing up to 90% in 25 min.

The obtained results permitted us to determine the optimum moment for the plant collection that will allow the best phenolic acid yield.

K.W.: *Origanum, Labiatae*, phenolic acids, HPLC

INTRODUCCIÓN

Desde muy antiguo, el orégano es utilizado como planta medicinal por sus propiedades expectorantes, espasmolíticas, analgésicas, antibacterianas, emenagogas, parasiticidas, estomáquicas y tónicas (Perrot et al., 1971). En los últimos tiempos se ha visto incrementado su uso en las industrias cosmética, farmacéutica y licorera, e incluso como planta ornamental, pero especialmente por la industria alimentaria, la cual lo emplea no sólo como condimento de sus productos, sino también, y principalmente, como antioxidante y conservante de los mismos.

La mayoría de las especies del género *Origanum* se localizan en la región este del Mediterráneo, existiendo unas pocas en la zona oeste. Casi todas las especies habitan en áreas muy restringidas: el 70% es endémica de alguna isla o grupo de montañas; únicamente *O. vulgare* ocupa una amplia zona que abarca desde las islas Azores hasta Taiwan. Normalmente, las especies de este género crecen en regiones montañosas y suelos con roca caliza; generalmente son ricas en aceites esenciales que contienen cantidades considerables de carvacrol y timol.

La especie *O. x majoricum* Cambessedes (= *O. majorana* x *vulgare* ssp *virens*) es endémica de las islas Baleares, según Ietswaart, . Dentro del estudio de los principios activos de esta especie, abordamos en el presente trabajo el análisis de los ácidos fenólicos de la misma, comparando su contenido en diversos estadios de la misma: fase previa a la floración, plena floración y después de la misma. El análisis de los resultados obtenidos nos permite determinar el momento óptimo para la recolección de la planta, de forma que se obtenga el máximo rendimiento en principios activos de tipo ácidos fenólicos, con posible aplicación como antioxidantes de las grasas animales, antifúngicos y bactericidas.

Para la realización del presente trabajo se ha puesto a punto un nuevo método de análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en su modalidad de fase inversa, utilizando como fase móvil Metanol (Bomba A) y Agua-Ac. acético (Bomba B) en una elución en gradiente lineal durante 25 minutos, comenzando con 20% A y aumentándolo hasta el 90% en este tiempo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal.- *O. x majoricum* Cambessedes fue cultivado y recolectado en tres parcelas en Marchamalo (Guadalajara, España). Se realizaron cuatro cortes de cada parcela: dos cortes antes de la floración (I, II), un corte en flor (III) y un corte después de la floración (IV). Este proceso se repitió en dos recolecciones; la primera de ellas se extendió desde el 5 de mayo hasta el 4 de julio, y la segunda, desde el 20 de julio hasta el 14 de septiembre.

Todas las muestras fueron desecadas a temperatura ambiente, y posteriormente fueron pulverizadas y convenientemente almacenadas hasta su utilización.

Extracción.- Se escogió un proceso de extracción por maceración y percolación a temperatura ambiente, según Alonso et al., 1988; la figura 1 recoge el esquema del citado proceso de extracción.

Sustancias patrón.- Se utilizaron los ácidos gálico, protocatéquico, clorogénico, gentísico, vainíllico, caféico, siríntrico, m-cumárico, 4-hidroxicinámico, sinápico, ferúlico y cinámico, todos ellos de pureza HPLC.

Sistema cromatográfico.- Los análisis se llevaron a cabo en un cromatógrafo modular Perkin Elmer: procesador de datos Perkin Elmer Sigma 15 conectado a un espectrofotómetro LC-75 a $\lambda = 280$ nm. Se empleó una columna Spherisorb ODS 2, 250 x 4.6 mm, 5 μm (Sugelabor, España). Como eluyentes se escogieron Metanol en la bomba A y Agua-Ac. acético (98:2, v/v) en la bomba B (el ácido acético se adicionó para evitar la aparición de colas en los picos). Todos los solventes eran de pureza HPLC y fueron filtrados a través de un filtro de 0.45 μm de diámetro de poro y desgasificados antes de ser utilizados. Los extractos acetato de etilo de las distintas muestras se diluyeron en 5 ml de Metanol:Agua-Ac. acético (98:2, v/v) (50:50). La elución de la fase móvil fue en gradiente lineal, comenzando con 20% A y 80% B, y llegando hasta 90% A en 25 minutos. Se inyectaron muestras de 10 μl ; el flujo de la fase móvil fue de 0.9 ml/min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra los tiempos de retención (t_R) \pm Desviación Standard (DS), factores de capacidad (k') y selectividad (α) de los patrones ($t_0 = 1.10$ min, flujo: 0.9 ml/min).

En las tablas 2 y 3 se recogen los contenidos en ácidos fenólicos para la 1ª y 2ª recolección, respectivamente, expresados en porcentaje en peso de planta seca.

Primera recolección.- El contenido máximo en ácidos fenólicos totales se obtiene justo antes de la floración, y el mínimo, cuando la planta se encuentra en flor. De forma individualizada, todos los ácidos alcanzan su nivel máximo antes o mucho antes de la floración, excepto vainíllico, caféico y cinámico, que lo hacen después de ésta.

Segunda recolección.- El contenido más elevado en ácidos fenólicos se obtiene mucho antes de la floración, y el mínimo, después de la floración. Los ácidos gentísico y ferúlico alcanzan su máximo cuando la planta se encuentra en flor, y el ácido sinápico, después de la floración; el resto de los ácidos estudiados presentan su rendimiento máximo antes de la floración.

De forma global, durante la primera recolección, el máximo contenido en ácidos fenólicos se da justo antes de la floración; su nivel disminuye y se hace mínimo cuando la planta se encuentra en flor, y vuelve a aumentar después de la floración, hasta alcanzar un nuevo máximo en la segunda recolección, mucho antes de que la planta se encuentre en flor.

Por lo tanto, se trate tanto de la primera como de la segunda recolección, el rendimiento en ácidos fenólicos más favorable se da antes de la floración, y será éste el momento más apropiado para la recolección de la planta. Se debe tener en cuenta, además, que existen dos momentos con un contenido máximo, lo cual representa un factor muy positivo en la rentabilidad de su cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

ALONSO, M. & BARRA TEMES, S. (1988) Publicaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

CHARPENTIER, B.A. & COWLES, J.R. (1981) . Rapid method of analyzing phenolic compounds in *Pinus ellioti* using HPLC. J. Chromatogr., 208: 132-140

HARTLEY ROY, D. & BUCHAN, H. (1979). HPLC of phenolic acids and aldehydes derived from plants J. Chromatogr., 180: 139-147

LETSWAART, J.H. A taxonomic revision of the Genus *Origanum* (*Labiatae*). Leiden Botanical Series, 4

MOLLERUP, A.J. & BATSBERG, P.W. (1983). Analysis of plant phenolics by high-performance liquid-chromatography. *J. Chromatogr.*, 259: 131-139

PERROT, E. & PARÍS, R. (1971). *Les Plantes Medicinales*, Vol. 2, Presses Universitaires de France

Selecciones del READER'S DIGEST: Secretos y virtudes de las plantas medicinales (1981). p. 238. 1ª Ed., Madrid

Ac. fenólicos	$t_r \pm DS$ (min)	k'	α
Ac. gálico	5.68±0.01	4.16	-
Ac. protocatéquico	7.64±0.15	5.94	1.42
Ac. clorogénico	10.62±0.10	8.65	1.45
Ac. gentísico	10.82±0.21	8.83	1.02
Ac. vainíllico	12.22±0.01	10.10	1.14
Ac. caféico	12.43±0.03	10.30	1.01
Ac. siríngico	13.11±0.22	10.91	1.05
Ac. 4 hidroxicinámico	14.90±0.02	12.54	1.15
Ac. sinápico	14.94±0.01	12.58	1.00
Ac. m-cumárico	15.56±0.15	13.15	1.04
Ac. ferúlico	15.69±0.20	13.26	1.01
Ac. cinámico	20.70±0.22	17.81	1.34

TABLA 1 Tiempos de retención, Factores de capacidad y selectividad de los ácidos fenólicos. Columna Spherisorb ODS2, 25 cm x 4,6 mm, 5 μ m. Fase móvil: Metanol- Agua:Ac. acético (98:2, v/v), en gradiente lineal tal y como se describe en el apartado Material y Métodos. Tiempo de análisis: 25 min; flujo: 0.9 ml/min; t_0 = 1.10 min

1ª recolección	1 ^{er} corte	2 ^{er} corte	3 ^{er} corte	4 ^{er} corte
1	0.095	0.109	0.047	0.059
2	0.156	0.176	0.093	0.097
3	0.052	0.052	0.025	0.027
4	0.658	0.653	0.318	0.429
5		0.059	0.032	0.070
6	0.006	tr	0.183	0.310
7	0.044	0.041		0.031
8		0.079		
9		0.128		
10	0.136	0.113		0.078
11		0.030		
12	tr	tr	0.002	0.003
TOTAL	1.147	1.440	0.637	1.104

TABLA 2 Contenido en ácidos fenólicos en los cuatro cortes de la primera recolección de *Origanum x majoricum*

2ª recolección	1ª siega	2ª siega	3ª siega	4ª siega
1	0.095	0.096	0.095	0.093
2	0.125	0.124	0.099	0.095
3	0.053	0.054	0.053	
4	0.725	0.617	0.630	0.643
5	0.058	0.050	0.072	0.066
6	tr			
7	0.040	0.047		
8	0.070	0.071		
9	0.099	0.104	0.118	0.126
10	0.112		0.109	0.114
11	0.029	0.038	0.035	0.034
12	tr	0.009	tr	
TOTAL	1.406	1.209	1.382	1.171

1 2

TABLA 3 Contenido en ácidos fenólicos en los cuatro cortes de la segunda recolección de *Origanum x majoricum*

¹ 1: Ac. gálico; 2: Ac. protocatéquico; 3: Ac. clorogénico; 4: Ac. gentísico; 5: Ac. vainíllico; 6: Ac. caféico; 7: Ac. siríngico; 8: Ac. 4-hidroxicinámico; 9: Ac. sinápico; 10: Ac. ferúlico; 11: Ac. m-cumárico; 12: Ac. cinámico.

² tr: trazas: % < 0.0001

Figura 1 Proceso de extraccion de acidos fenolicos

